大韓不妊學會誌: 第29卷 第2號 2002
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 29, No. 2, 2002, 6

Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF)의 첨가가 생쥐 수정란의 발생과 착상관련 유전자 발현에 미치는 영향

을지병원 의과학연구소[1], 을지대학교 의과대학 생리학교실[2], 산부인과학교실[4], 서울보건대학 임상병리과[3]

김동훈[1] · 고덕성[1] · 이회창[1] · 이호준[2] · 강희규[3] · 김태전[3] · 박원일[4] · 김세웅[4]

Effect of GM-CSF on the Embryonic Development and the Expression of Implantation Related Genes of Mouse Embryos

Dong-Hoon Kim[1], Duck-Sung Ko[1], Hoi-Chang Lee[1], Ho-Joon Lee[2], Hee-Gyoo Kang[3], Tai-Jeon Kim[3], Won-Il Park[4], Seung Samuel Kim[4]

Medical Science Institute[1], Eulji General Hospital, Department of Physiology[2] and OB/GYN[4], Eulji University School of Medicine, Department of Medical Technology[3], Seoul Health College

Objective: The purpose of the current series of experiments were to assess the effect of GM-CSF, as a medium supplement, on the development of mouse embryos and the expression of LIF and IL-1? mRNA.

Materials and Methods: Mouse 2-cell embryos were collected from the oviducts of 6 weeks old ICR mice at 48 hours after hCG injection. Embryos were cultured in P-1 medium supplemented with mouse GM-CSF (0, 1, 5, 10 ng/ml). The embryo development to blastocysts and hatching blastocysts was assessed and the cell number in blastocyst was also examined. Using RT-PCR, the expressions of LIF and IL-1? mRNA in blastocyst were evaluated in the GM-CSF supplemented group and control group.

Results: In mouse, the addition of GM-CSF increased the percentage of blastocysts (65.5%, 68.6%, 73.0% and 76.1% for control and 1, 5 and 10 ng/ml, respectively), and increased the proportion of hatching blastocysts (35.2%, 36.4%, 43.2% and 53.0% for control and 1, 5 and 10 ng/ml, respectively). The mean cell numbers in blastocyst were significantly increased in GM-CSF supplemented groups compared to control group. LIF and IL-1? expression in blastocyst were significantly higher in GM-CSF supplemented group than in control group.

Conclusion: The results of experiment by mouse embryos showed beneficial effects of GM-CSF as a medium supplement. Furthermore, the addition of GM-CSF significantly increased the expression of LIF and IL-1? in mouse embryos. These results suggest that GM-CSF might be a important molecule in embryo implantation.

Key Words: GM-CSF, Mouse embryo, LIF, IL-1?

연락저자: 김동훈, 우) 139-711 서울특별시 노원구 하계1동 280-1, 을지병원 의과학연구소
Tel: (02) 970-8714, Fax: (02) 970-8002, e-mail: kdhemsi@eulji.or.kr
주관책임자: 이호준, 우) 301-110 대전광역시 중구 용두2동 143-5, 을지대학교 의과대학 생리학교실
Tel: (042) 259-1086, e-mail: leehj@eulji.or.kr

포유동물 수정란의 체외배양에 관한 연구에 있어서, 주요 초점은 자성생식기관의 환경에 보다 가까운 체외배양체계를 개발함으로서 수정란의 질을 향상시키는 것이다. 설치류와 가축에 대한 연구에 의하면 수정란의 성장과 발달은 난관이나 자궁에서 분비되는 cytokine과 성장인자 (growth factor)들에 의하여 조절된다고 보고하고 있다.[1] 사람을 포함한 대부분 동물들의 수정란은 생식기관에서 분비되는 성장인자들에 대한 수용체를 가지고 있으며,[2,3] 따라서 배양액에 이러한 cytokine과 성장인자의 첨가는 수정란의 발달을 증진시키는 것으로 알려져 있다. 일례로 EGF는 배발달과 trophoblast의 outgrowth를 증가시켜서 착상율을 향상시키며,[4~6] insulin-like growth factor-I (IGF-I)과 insulin-like growth factor-II (IGF-II)는 배반포의 형성과 세포수를 증가시키며, 특히 내부세포괴의 세포수를 증가시키는 것으로 알려져 있으며,[7,8] leukemia inhibitory factor (LIF)는 배반포의 부화율과 trophoblast의 outgrowth를 증가시키며,[9] 그리고 platelet-derived growth factor (PDGF)도 배반포의 발달을 촉진한다고 보고하고 있다.[10]

Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)는 활성화된 T-lymphocyte에서 생산되는 cytokine의 일종인 것으로 처음에 알려졌으며, 이것은 조혈세포의 증식과 분화를 조절하는 작용을 하는 것으로 보고되고 있다.[11] 또한 GM-CSF는 생쥐, 면양 그리고 사람의 자궁과 난관의 상피세포에서 분비되는 것으로도 보고되고 있다.[12~14] 지금까지 보고된 동물 실험의 결과는 GM-CSF가 수정란의 발달을 촉진시키는 것으로 알려져 있다. 생쥐에 있어서 GM-CSF는 배반포 발달율과 세포수를 증가시키며,[15] 소에 있어서도 체외성숙 및 발달된 수정란에서 배반포까지의 발달율을 증가시킨다고 보고하고 있다.[16] 그리고 면양의 경우에는 GM-CSF가 배반포의 trophectoderm에서 interferon (IFN)-?의 발현을 증가시킴으로서 배반포의 착상능력을 증진시키는 것으로 알려져 있다.[13]

이러한 보고들을 살펴볼 때, GM-CSF는 수정란의 발달과 착상에 영향을 주는 것으로 사료된다. 따라서 본 연구의 목적은 생쥐 수정란을 이용하여 배양액 내 GM-CSF의 첨가가 수정란의 체외발달에 효과적인가를 알아보고 또한 수정란의 발달과 착상에 관여하는 것으로 알려진 LIF 그리고 IL-1? 유전자의 발현에 미치는 영향을 살펴보는데 있었다.

재료 및 방법

1. 생쥐 수정란의 준비

본 실험에 사용된 생쥐는 암컷은 생후 6주령, 수컷은 생후 12주령 이상된 ICR종이었다. 수정란을 획득하기 위하여 암컷 생쥐의 복강에 5 IU PMSG를 주사하고, 48시간 후에 5 IU hCG를 주사하여 과배란을 유도하였으며, 수컷 생쥐와 1 : 1의 비율로 합사시켜서 교미를 유도하였다. hCG 주사 후 48시간째에 경추탈골법을 이용하여 생쥐를 희생시킨 후, 적출된 난관을 관류하여 2-세포기의 수정란을 회수하였다.

2. 수정란의 배양

회수된 2-세포기 수정란은 0.4% BSA가 첨가된 P-1 배양액 소적 (30 ?l)에 mineral oil을 피복시켜서 배양을 하였으며, recombinant mouse GM-CSF (Sigma, USA)는 0, 1, 5, 10 ng/ml 농도로 각각 배양액에 첨

Table 1. Oligonucleotide primers and cycling condition for PCR

Gene	Primer sequence	Product size	Condition
?-actin	5'GTGGGCCGCTCTAGGCACCAA 3'CTCTTTGATGTCACGCACGATTTC	539 bp	94℃ 45 s, 54℃ 45 s, 72℃ 1 m
LIF	5'CATTTCCTATTACACAGCTCA 3'ACACGGTACTTGTTGCACAGA	293 bp	94℃ 30 s, 58℃ 45 s, 72℃ 45 s
IL-1?	5'CTTTGAAGAAGAGCCCATCCT 3'GGATCCACACTCTCCAGCTGC	323 bp	94℃ 45 s, 54℃ 45 s, 72℃ 1 m

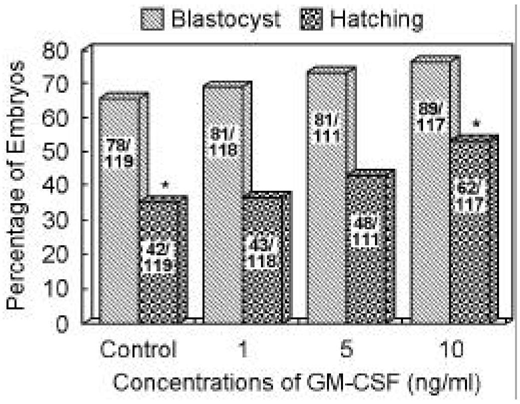

Figure 1. The effect of GM-CSF concentrations on the development of mouse embryos. *Asterisks above columns donate significant differences ($p<0.05$).

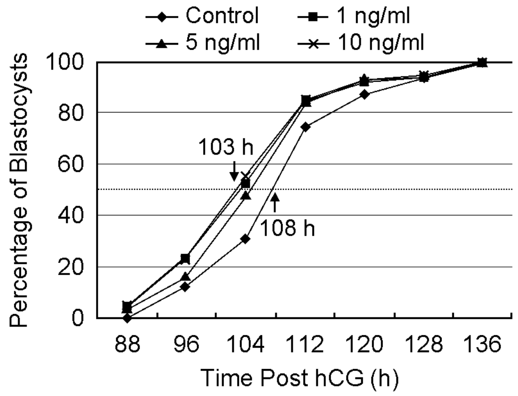

Figure 2. The effect of GM-CSF on the velocity of blastocyst development.

가하여 실험에 이용하였다. 배반포의 관찰은 배양 3일째, 완전 부화된 배반포의 관찰은 배양 5일째 실시하였다.

3. 세포수의 조사

각 처리군에서 발달된 배반포의 세포수를 비교하여 위하여, 배양 3일째에 배반포로 발달한 수정란 염색을 실시하였다. 배반포는 0.2% formaldehyde로 10분간 고정을 실시한 후, 슬라이드에 올린 후, 2.5 ?g/ml hoechst 33342로 염색을 하였다. 그리고 염색된 배반포의 세포수는 형광현미경 하에서 조사하였다.

4. 역전사 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

배양 3일째 각 처리군에서 발달된 배반포를 50개

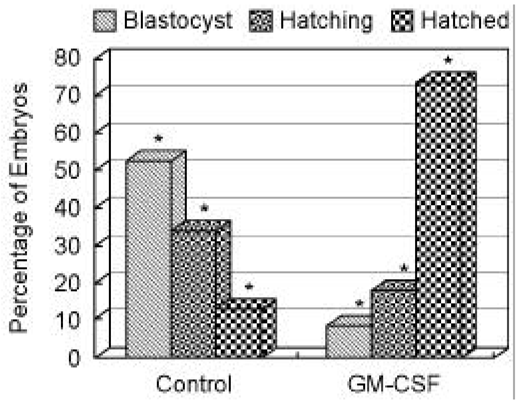

Figure 3. The effect of GM-CSF on the hatching of blastocysts. The concentration of GM-CSF was 10 ng/ml. *Asterisks above columns donate significant differences ($p<0.05$).

Table 2. Cell number of blastocyst cultured in medium alone and in the presence of GM-CSF

Treatment	No. of blastocysts	No. of cells (mean±SEM)	Range
Control	16	67.9±17.1[a]	32~86
1 ng/ml	15	95.1±20.8[b]	56~131
5 ng/ml	15	91.6±12.4[b]	63~116
10 ng/ml	15	92.0±12.4[b]	69~124

[a,b] $p<0.001$

씩 회수하여 0.1% PVP가 첨가된 PBS로 2회 세척을 실시한 후, TRIzol (Gibco BRL, USA)을 이용하여 total RNA를 추출하였으며, 추출된 Total RNA로부터 oligo d (T) primer를 이용하여 cDNA를 합성한 후 PCR을 수행하였다.

중합효소 연쇄반응은 fidelity가 검증된 primer를 사용하였으며 (Table 1), 반응이 끝난 생성물은 2% agarose gel로 전기영동을 실시한 후, ethidium bromide로 염색하여 확인하였다. 동량의 RNA로부터의 상대적인 발현 양을 비교하기 위하여 ?-actin을 control로 사용하였다. LIF 그리고 IL-1?의 발현 정도는 densitometer (Vilber Lourmat, France)를 이용하여 측정하였다.

5. 통계 처리

본 연구에서 얻어진 실험 결과의 통계 처리는 ?[2]

test와 student's t-test를 이용하였으며, p값이 0.05 보다 작은 경우만 통계학적 차이로 인정하였다.

결 과

1. 생쥐 수정란의 발달율과 부화율에 미치는 GM-CSF의 영향

GM-CSF 농도에 따른 배반포까지의 발달율은 첨가 농도가 증가됨에 따라 발달율이 증가되는 양상을 보여주었으나 대조군과 GM-CSF 첨가군들 간에 유의한 차이를 나타내지 않았으며, 또한 GM-CSF 첨가군들 간에도 유의한 차이를 보여주지 않았다 (Figure 1). 배반포의 부화율에 있어서도 GM-CSF의 첨가 농도가 증가됨에 따라 증가되는 양상을 보여주었지만 10 ng/ml GM-CSF 첨가군만이 대조군에 비하여 유의하게 높은 부화율을 보여주었다 ($p<0.05$). 배반포의 발달 속도를 살펴보기 위하여 50%의 배반포가 형성되는 시간을 비교한 결과는 10 ng/ml GM-CSF 첨가군이 hCG 투여 후 103시간, 대조군은 108시간으로서, GM-CSF 첨가군에서 배발달이 보다 빨리 진행되는 것으로 관찰되었다 (Figure 2). 이러한 결과들을 종합해 볼 때, 본 연구에서는 10 ng/ml의 농도로 GM-CSF를 첨가하는 것이 가장 좋은 결과를 나타냈으며 이후 실험부터는 10 ng/ml의 농도로 GM-CSF를 첨가하였다.

2. 배반포 세포수의 비교

배양 3일째에 배반포의 발생능력을 나타내는 중요한 지표인 배반포의 세포수를 조사한 결과 (Table 2)는 1 ng/ml이 95.1±20.8, 5 ng/ml이 91.6±12.4 그리

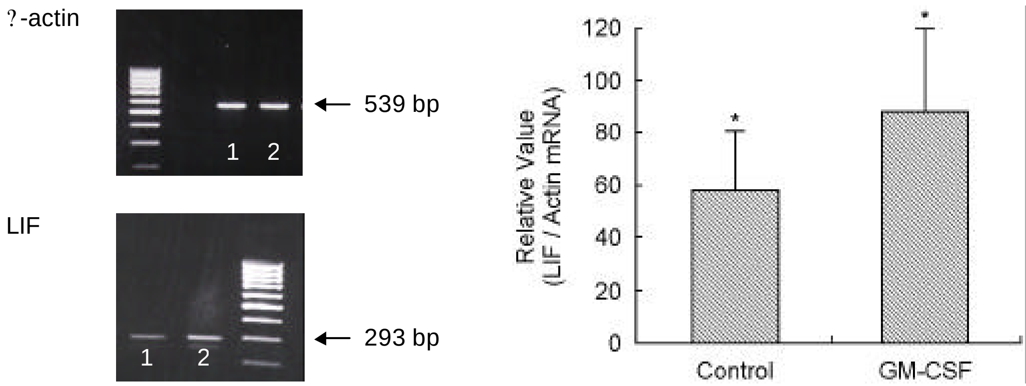

Figure 4. The effect of GM-CSF on the expression of LIF. 1: Control, 2: GM-CSF. *Asterisks above columns donate significant differences ($p<0.05$).

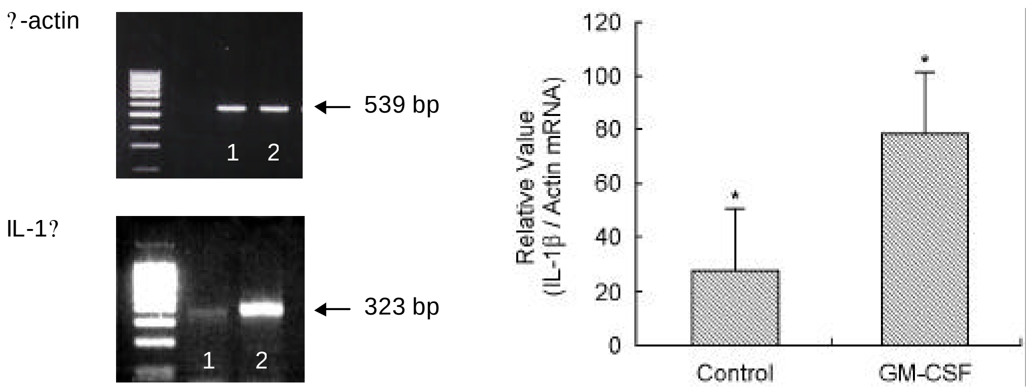

Figure 5. The effect of GM-CSF on the expression of IL-1?. 1: Control, 2: GM-CSF. *Asterisks above columns donate significant differences ($p<0.05$).

고 10 ng/ml이 92.0±12.4로서 대조군의 67.9±17.1 보다 유의하게 많은 세포수를 나타냈다 ($p<0.001$).

3. 배반포의 완전부화에 미치는 GM-CSF의 영향

배반포로 발달된 수정란의 완전부화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 배양 5일째에 배반포 중에서 완전히 부화된 배반포의 비율을 조사한 결과 (Figure 3)는 GM-CSF 첨가군 (10 ng/ml)이 73.6%로서 대조군의 13.0% 보다 유의하게 높은 결과를 나타냈다 ($p<0.05$).

4. LIF, IL-1? mRNA의 발현에 미치는 GM-CSF의 영향

수정란의 발달과 착상에 관여하는 것으로 알려진 LIF와 IL-1? mRNA 발현에 GM-CSF의 영향을 조사하였다. LIF와 IL-1? mRNA의 발현은 GM-CSF 첨가군이 대조군에 비하여 유의하게 높은 발현 양상을 나타냈다 (Figure 4, 5).

고 찰

GM-CSF는 활성화된 T-lymphocyte에서 분비되며, 주로 조혈세포의 증식과 분화를 조절하는 것으로 처음에 보고되었다.[11] 그러나 현재 GM-CSF는 단핵구, 대식세포, 섬유아 세포 그리고 내피세포를 포함한 다양한 세포에서 분비되는 것으로 알려져 있다.[17] GM-CSF는 표적세포에 존재하는 ?와 ? subunit로 구성된 heterodimeric receptor complex에 결합함으로서 그 기능을 발휘하며,[18] ? subunit는 GM-CSF 특이적이고, ? subunit은 IL-3와 IL-5 receptor와 공유하는 것으로 알려져 있다.[19]

최근에 GM-CSF는 생식기능에도 중요한 역할을 하는 것으로 확인되고 있다. 생식기관에 있어서 GM-CSF는 estrogen의 영향에 의하여 자궁과 난관의 상피세포에서 분비된다는 것이 생쥐, 면양 그리고 사람에서 확인되었다.[12~14] 생쥐에 있어서 자궁 내에서 GM-CSF 합성의 증가는 착상전 기간 동안에 일어나며,[20] 착상시기에는 progesterone의 영향에 의하여 감소하지만,[21] 활성화된 GM-CSF는 임신 기간 동안에 태반과 탈락막 조직에 존재하는 것으로 알려져 있다.[12]

수정란의 발달에 있어서 GM-CSF는 하나의 중요한 요소임이 제시되어 왔다. 생쥐 착상전 수정란은 GM-CSF receptor 중에 ? subunit을 발현하며, 배양액에 GM-CSF의 첨가는 수정란의 glucose uptake를 증가시킴으로서 배반포 발달과 부화에 유효한 효과가 있는 것으로 나타났다.[15] 최근에는 GM-CSF 유전자 결함 생쥐에서 배반포의 발달이 지연되며, 세포수가 유의하게 감소하며, 임신 후 태아의 크기가 작으며 그리고 태아의 흡수율이 증가하여 산자수가 감소한다고 보고하고 있다.[22] 그리고 체외성숙 및 수정된 수정란의 발달에 있어서도 GM-CSF의 첨가는 배반포의 발달을 증가시킨다고 알려져 있다.[16] 본 연구에서도 GM-CSF의 첨가는 생쥐 수정란의 배반포까지의 발달을 증가시키는 경향을 보여주었으며, 농도가 증가함에 따라 발달이 점진적으로 증가하는 것으로 나타났으며, 10 ng/ml의 농도에서 가장 좋은 발달율을 보여주었다. 따라서 이후 실험부터는 10 ng/ml의 농도로 고정하여 실험을 실시하였다. 한편 Robertson 등[15]은 2 ng/ml의 농도가 적정한 GM-CSF 첨가 농도임을 제시하였으며, 본 연구 결과와는 차이를 나타냈는데, 이러한 차이는 Robertson 그룹은 단백질 첨가제로서 serum을 사용하였고, 본 실험에서는 albumin을 사용하였기 때문인 것으로 추정이 된다. 배반포의 발생능에 있어서 중요한 지표인 세포수의 경우도 GM-CSF를 첨가하면 유의하게 증가되는 것으로 본 연구에서 확인되었으며, 이러한 결과는 Robertson 등[15]의 보고와 일치하는 결과이다. 일반적으로 성장인자는 apoptosis를 통한 수정란의 세포사멸을 억제하는데 중요한 역할을 한다. 생쥐에 있어서 apoptosis는 배반포의 60~110 세포기에서 일어나며, 특히 inner cell mass에서 두드러지게 나타나는데, 이것은 체외배양에 따른 자성생식기관에 존재하는 paracrine factor들의 부족에 기인한 것으로 알려져 있다.[23] 따라서 배반포의 세포수에 있어서 GM-CSF의 효과는 apoptosis의 감소와 연관이 있을 것으로 생각된다. 그리고 배반포로 발달한 수정란의 완전부화율을 조사한 결과는 GM-CSF를 첨가하게 되면 유의하게 높은 결과를 보여주었다. 이러한 결과들을 살펴볼 때, GM-CSF는 세포수를 증가시킴으로서 배반포의 질을 향상시키고 따라서 착상 가능한

완전부화된 배반포로의 진행을 향상시키는 것으로 사료된다.

지금까지 수정란의 발달에 있어서 GM-CSF에 대한 연구 보고들은 주로 배반포의 형성, 부화 그리고 부착 (attachment)과 같은 현상에 관한 것들 일 뿐, 어떤 기전에 의하여 수정란의 발달에 유효한 영향을 주는가에 대해서는 단 하나의 연구 보고만이 있다. Imakawa 등[13]은 면양 수정란을 GM-CSF가 첨가된 배양액에서 배양하면 배반포의 trophectoderm에서 anti-luteotrophic signal interferon (INF)-?(oTP-1)의 발현을 증가시켜서 착상능력을 향상시킨다고 보고하고 있다. 본 실험에서는 GM-CSF가 어떠한 기전에 의하여 수정란의 발생능력을 향상시키는가를 살펴보고자 RT-PCR 방법을 이용하여 LIF 그리고 IL-1? mRNA의 발현을 조사하였다. LIF는 착상과정에서 필수적인 요소인 것으로 알려져 있다. 그것은 생쥐에 있어서 LIF 유전자가 결함된 자성 생쥐는 배반포까지 발달하는 수정란을 생산할 수는 있지만 이러한 배반포는 착상을 할 수 없기 때문이다.[24] 그리고 배양시 LIF를 첨가하면 생쥐의 경우에는 배반포 발달을 증진시키며,[24] 면양의 경우에는 배반포의 부화와 임신율을 향상시키며,[25] 또한 사람에 있어서도 배반포의 형성을 증진시킨다고 보고하고 있다.[26] 본 실험에서 배반포의 LIF mRNA 발현을 조사한 바, GM-CSF 첨가군에서 대조군에 비하여 유의하게 높은 발현 양상을 보여주었다. 따라서 GM-CSF는 수정란의 발달과 착상에 관여하는 요소 중에 하나인 LIF를 증진시킴을 확인할 수 있었다. 다른 유전자인 IL-1?는 IL-1 family (IL-1? , IL-1?, IL-1ra) 중의 하나로서, 이러한 IL-1 family는 주로 배반포의 초기착상과정에 관여하는 것으로 알려져 있다.[27] 그리고 Simón 등[28]은 어떤 알려지지 않은 endometrial factor에 의하여 배반포에서 IL-1 family의 분비를 촉진하고, 이렇게 분비된 IL-1 family는 endometrial epithelial cells (EEC)에 작용하여 $?_3$의 증가를 유도함으로서 배반포가 ECC에 부착할 수 있도록 유도할 것이라고 추측하였다. 본 실험에서 GM-CSF를 처리하게 되면 IL-1? mRNA의 발현이 현저히 증가되는 것으로 나타났는데, 따라서 이러한 결과에 의하여 GM-CSF가 Simón 등이 추정하는 endometrial factor 중의 하나가 아닌가 사료된다. 그리고 앞으로 배반포의 착상에 있어서 GM-CSF가 IL-1 family에 미치는 영향에 대한 보다 심도 있는 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

결론적으로 생쥐 수정란에 대한 실험 결과는 GM-CSF가 배양액의 첨가제로서 유효한 효과가 있음을 보여주었고, 특히 GM-CSF는 수정란에서 착상관련 물질의 분비를 증가시키는 역할을 하는 것으로 추정된다. 따라서 이러한 결과들을 기초로 하여 사람 수정란의 배양에 GM-CSF의 첨가한다면 수정란의 발달을 증진시키며 그리고 임신율 향상에도 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Robertson SA, Seamark RF, Guilbert LJ, Wegmann TG. The role of cytokines in gestation. Crit Rev Immunol 1994; 14: 239-92.
2. Pampfer S, Arceci RJ, Pollard JW. Role of colony stimulating factor-1 (CSF-1) and other lympho-hematopoietic growth factors in mouse pre-implantation development. Bioessays 1991; 13: 535-40.
3. Sharkey AM, Dellow K, Blayney M, Macnamee M, Charnock-Jones S, Smith SK. Stage-specific expression of cytokine and receptor messenger ribonucleic acids in human preimplantation embryos. Biol Reprod 1995; 53: 974-81.
4. Paria BC, Dey SK. Preimplantation embryo development in vitro: cooperative interactions among embryos and role of growth factors. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 4756-60.
5. Morita Y, Tsutsumi O, Taketani Y. In vitro treatment of embryos with epidermal growth factor improves viability and increases the implantation rate of blastocysts transferred to recipient mice. Am J Obstet Gynecol 1994; 171: 406-9.
6. Muzikova E, Clark DB. Polyamines may increase the percentage of in-vitro fertilized murine oocytes that develop into blastocysts. 1995; 10: 1172-7.
7. Harvey MB, Kaye PL. Insulin-like growth factor-I stimulates growth of mouse preimplantation embryos in vitro. Mol Reprod Dev 1992; 31: 195-9.

8. Rappolee DA, Sturm KS, Behrendtsen O, Schultz GA, Pedersen RA, Werb Z. Insulin-like growth factor-II acts through and endogenous growth pathway regulated by imprinting in early mouse embryos. Genes Dev 1992; 6: 939-52.
9. Lavranos TC, Rathjen PD, Seamark RF. Trophic effects of myeloid leukemia inhibitory factor (LIF) on mouse embryos. J Repord Fertil 1995; 105: 331-6.
10. Yang BK, Yang X, Foote RH. Effect of growth factors on morula and blastocyst development of in vitro matured and in vitro fertilized bovine oocytes. Theriogenology 1993; 40: 521-30.
11. Ruef C, Coleman DL. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: pleiotropic cytokine with potential clinical usefulness. Rev Infact Dis 1990; 12: 41-62.
12. Robertson SA, Mayrhofer G, Seamark RF. Uterine epithelial cells synthesize granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-6 in pregnant and nonpregnant mice. Biol Reprod 1992; 46: 1069-79.
13. Imakawa K, Helmer SD, Nephew KP, Meka CS, Christenson RK. A novel role for GM-CSF: enhancement of pregnancy specific interferon production, ovine trophoblast protein-1. Endocrinology 1993; 132: 1869-71.
14. Giacomini G, Tabibzadeh SS, Satyawaroop PG. Epithelial cells are the major source of biologically active granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in human endometrium. Hum Reprod 1995; 10: 3259-63.
15. Robertson SA, Sjoblom C, Jasper MJ, Norman RJ, Seamark RF. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes glucose transport and blastomere viability in murine preimplantation embryos. Biol Reprod 2001; 64: 1206-15.
16. de Moraes AA, Hansen PJ. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes development of *in vitro* produced bovine embryos. Biol Reprod 1997; 57: 1060-5.
17. Cousins DJ, Staynoz DZ, Lee TH. Regulation of interleukin-5 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expression. Am J Respir Crit Care Med 1994; 150: S50-S53.
18. Park LS, Martin U, Sorensen R, Luhr S, Morrissey PJ, Cosman D, et al. Cloning of the low-affinity murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor and reconstitution of a high-affinity receptor complex. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 4295-9.
19. Miyajima A, Mui AL, Ogorochi T, Sakamaki K. Receptors for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-3, and interleukin-5. Blood 1993; 82: 1960-74.
20. Tremellen KP, Seamark RF, Robertson SA. Seminal transforming growth factor beta 1 stimulates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production and inflammatory cell recruitment in the murine uterus. Biol Reprod 1998; 58: 1217-25.
21. Robertson SA, Mayrhofer G, Seamark RF. Ovarian steroid hormones regulate granulocyte-macrophage colony-stimulating factor synthesis by uterine epithelial cells in the mouse. Biol Reprod 1996; 54: 183-96.
22. Robertson SA, Roberts CT, Farr KL, Dunn AR, Seamark RF. Fertility impairment in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-deficient mice. Biol Reprod 1999; 60: 251-61.
23. Hardy K. Cell death in the mammalian blastocyst. Mol Hum Reprod 1997; 3: 919-25.
24. Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Kontgen F, et al. Blastocyst implantation depend on maternal expression of leukemia inhibitory factor. Nature 1992; 359: 76-9.
25. Fry RC, Batt PA, Fairclough RJ, Parr RA. Human leukemia inhibitory factor improves the viability of ovine embryos. Biol Reprod 1992; 46: 470-4.
26. Dunglison GF, Barlow DH, Sargent IL. Leukaemia inhibitory factor significantly enhances the blastocyst formation rates of human embryos cultured in serum-free medium. Hum Reprod 1996; 11: 191-6.

27. Huang H-Y, Krussel JS, Wen H, Wen Y, Polan ML. Use of reverse transcription-polymerase chain reaction to detect embryonic interleukin-1 system messenger RNA in individual preimplantation mouse embryos co-cultured with Vero cells. Hum Repord 1997; 12: 1537-44.
28. Simón C, Moreno C, Remohi J, Pellicer A. Molecular interactions between embryos and uterus in the adhesion phase of human implantation. Hum Repord 1998; 18 (suppl): 219-32.